

細胞内及びミトコンドリア内superoxide dismutase の虚血脳病態における役割 - 遺伝子欠損マウスを用 いた検討

著者	近藤 健男
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54964

①

博士論文

細胞質内及びミトコンドリア内superoxide

dismutaseの虚血脳病態における役割

= 遺伝子欠損マウスを用いた検討 =

東北大学医学部脳神経外科

近藤 健男

①

博士論文

細胞質内及びミトコンドリア内superoxide

dismutaseの虚血脳病態における役割

= 遺伝子欠損マウスを用いた検討 =

東北大学医学部脳神経外科

近藤 健男

(1) 要約

脳虚血再灌流後の脳梗塞の形成には低酸素再酸素化によって発生する活性酸素が重要な役割を演じているとされている。Superoxide dismutase (SOD) は、活性酸素種のなかで特に細胞毒性の強いsuperoxide (O_2^-) を消去する酵素であり、虚血後の脳梗塞の形成に対して保護的な働きをしていると報告されている。SODには細胞質内に局在するCuZn-SOD (SOD-1)、ミトコンドリアに局在するMn-SOD (SOD-2)、細胞外液に存在するextracellular-SOD (SOD-3) の3分画が存在することが知られているが、それぞれのSODの生物学的意義は正常状態下および病態下においても未だ不明な点が多い。本研究においては、CuZn-SODまたはMn-SODの活性が正常のマウスと比較して低下している遺伝子欠損マウスを用いて脳虚血再灌流後の病態におけるCuZn-SODおよびMn-SODの役割を個々に検討した。

CuZn-SOD遺伝子欠損マウス (*Sod1* Kn) としては、CuZn-SOD活性が正常のマウスに比較して約 50 % に低下している heterozygous CuZn-SOD遺伝子欠損マウス (*Sod1* Kn +/-)、およびCuZn-SOD活性がほぼ 0 のhomozygous CuZn-SOD遺伝子欠損マウス (*Sod1* Kn -/-) を使用した。Mn-SOD遺伝子欠損マウス (*Sod2* Kn) としては、Mn-SOD活性が正常のマウスに比較して約 50 % に低下している heterozygous Mn-SOD遺伝子欠損マウス (*Sod2* Kn +/-) を使用した。本研究においては生後約 3 ヶ月の遺伝子欠損マウスを用い、コントロールとしては同時に出生した遺伝子欠損のない野生型 (wild-type ; WT) マウスを用いた。

局所脳虚血は全身麻酔下で経内頸動脈的に nylon糸を挿入し中大脳動脈を閉塞して作成した。また 1 時間の閉塞後nylon糸を抜去することで再灌流を行なった。再灌流後の脳梗塞形成に対する活性酸素の影響を検討するた

め、再灌流後経時的にマウスを断頭屠殺し、以下の種々のパラメーターについて各遺伝子欠損マウスと野生型マウスの間で比較検討を行った。

Sod1 Knにおいては虚血再灌流後の脳梗塞巣の経時的な進展を再灌流後 8、24、48、96 時間の脳切片をNissel染色で染色し、染色性の低下した梗塞巣の面積をimage analysis systemで定量化し、WTと比較検討した。また、脳梗塞の進展過程におけるapoptosisの役割を検討するため、組織内のDNAの断裂化をTUNEL法により染色し、apoptosisを起こしている神経細胞数をWTと比較検討した。急性期の脳浮腫についてblood-brain barrierの透過性を再灌流後 2、8、24 時間のEvans blue漏出の定量により評価し、WTと比較検討した。さらに虚血再灌流後 96 時間までの致死率および24時間の時点の運動機能について評価を行った。*Sod2* Knにおいては梗塞巣の体積と組織内の

DNAの断裂化を再灌流後1、4、8、16時間で*Sod1* Knと同様の方法で評価し、WTと比較検討した。

虚血再灌流後の脳梗塞巣の経時的進展においては、WTでは再灌流後4時間まではNissel染色で染色性の低下を認めなかったが、8時間後には虚血中心部の大脳基底核に染色性の低下を認め、この染色性の低下は再灌流の時間と共に大脳皮質領域まで拡大し、再灌流後16～24時間でプラトーに達した。

Sod1 Knでは梗塞巣の経時的進展はWTと同様であったが、再灌流後24時間で梗塞巣の体積はWTと比較して有意に拡大していた

(WT, $53.1 \pm 3.4\%$; *Sod1* Kn +/-, $64.2 \pm 5.5\%$; $p < 0.01$)。 *Sod2* Knでは再灌流後4時間よりWTと比較して有意な梗塞巣の形成を認めたが (WT, $3.5 \pm 3.2\%$; *Sod2* Kn +/-, $27.9 \pm 4.8\%$; $p < 0.01$)、再灌流後16時間では梗塞巣の体積はWTと比較し有意な差を認めなかった。次にTUNEL染色による

DNA断裂化においては、WTでは再灌流後8時間よりDNA断裂化細胞の出現を認め、16～48時間後にピークに達し、96時間後には消失していた。*Sod1* KnにおいてはDNAの断裂化は経時的にはWTと変わりなかったが、再灌流後24～48時間にWTと比較しDNA断裂化細胞数の有意な増加を認めた

($p<0.01-0.05$)。*Sod2* Knでは梗塞巣の形成を認めた再灌流後4時間ではDNA断裂化は認めず、その後の経過においてもWTと有意な差を認めなかった。またEvans blueの漏出については、再灌流後2時間ではWTにおいてEvans blue漏出の増加を認めなかったが、*Sod1* KnにおいてはSOD活性の低下に依存性にEvans blue漏出の有意な増加を認めた

(WT, 0.26 ± 0.02 ; *Sod1* Kn +/-, 0.81 ± 0.15 ; *Sod1* Kn -/-, 2.21 ± 0.49 $\mu\text{g} / \text{hemisphere}$; $p<0.05$)。再灌流後8、24時間ではWTにおいても経時的にEvans blue漏出は増加し、*Sod1* Knとの間に有意な差を認

めなかった。さらに*Sod1* Knにおける致死率については*Sod1* Kn -/-は再灌流後4時間以内に全マウスが死亡し、*Sod1* Kn +/-においても24時間の時点での致死率がWTと比較し高率であった (WT, 11.1%; *Sod1* Kn +/-, 23.8%)。また24時間の時点での運動機能についても*Sod1* Kn +/-においてWTと比較し有意な運動機能の低下を認めた。

以上の結果よりCuZn-SODによる細胞質内における O_2^- の消去は虚血再灌流後の脳浮腫形成およびapoptotic cell deathを抑制すること、またMn-SODによるミトコンドリアでの O_2^- の消去はミトコンドリアを保護することにより、energy failureによるnecrotic cell deathを抑制することが示唆された。これらの働きにより、CuZn-SODおよびMn-SODは脳梗塞巣の形成に保護的な役割を果たしていると考えられる。

(2) 研究背景

脳虚血再灌流障害においては血液脳関門 (BBB) 透過性亢進により引き起こされる脳浮腫¹や、興奮性アミノ酸による神経細胞の過度の脱分極²等が重要な増悪因子であると考えられているが、その発生にはsuperoxide (O_2^-) を始めとした活性酸素種が重要な役割を果たしていることが知られている^{1,3,4,5,6}。

正常状態における中枢神経系細胞では O_2^- は主にミトコンドリアの電子伝達系において産生されている^{7,8}。脳虚血再灌流後は電子伝達系に対する酸素の過剰供給や、虚血中の細胞内代謝の変化によるxanthine oxidase系やアラキドン酸カスケードの活性化により、ミトコンドリアや細胞質内において過剰の O_2^- が産生され、再灌流障害の重要な増悪因子になると考えられている^{3,4,5,9,10,11}。また、特に神経細胞においては虚血再灌流後に放出されるグルタミン酸に代表される興奮性アミ

ノ酸が再灌流障害の増悪因子として知られているが²、近年この興奮性アミノ酸による神経細胞障害においても O_2^- の産生が不可欠であることが報告され⁶、再灌流障害における O_2^- の重要性が再認識された。

さらに近年細胞死の一形態としてさまざまな病態においてその関与が注目されている apoptosis は、脳虚血再灌流障害においても脳梗塞巣の形成に重要な働きを演じていることが明らかになってきた^{12,13,14,15,16,17,18,19}。Apoptosis は細胞死の過程で蛋白合成を必須とし、特に DNase の活性化により細胞死の過程で特徴的なヒストン単位の DNA 断裂化を示すことが知られている。近年 nick endolabeling の手法により、この DNA 断片の断端をラベルし、組織学的手法で apoptosis を起こしている細胞の局在を評価する方法 (TUNEL 染色) が開発され²⁰、様々な分野で研究応用されている。この手法を用いた研究では、脳梗塞の形成における apoptosis の

関与は、特に再灌流後の遅発性の梗塞巣形成に重要であるとされている¹⁹。また神経細胞におけるapoptosisによる細胞死には O_2^- の関与が重要であるとの報告もあり²¹、これらの報告から再灌流障害において O_2^- はapoptosisを介して脳梗塞形成の増悪因子となっている可能性が考えられる。

これら O_2^- による障害に対する防御機構としてはsuperoxide dismutase (SOD) が O_2^- を速やかに過酸化水素に置換し、この過酸化水素をglutathione peroxidaseやcatalaseが水に代謝することで活性酸素種の最終的な無毒化が行われている。SODには細胞質内に局在するCuZn-SOD (SOD-1)、ミトコンドリアに局在するMn-SOD (SOD-2)、細胞外液に存在するextracellular-SOD (SOD-3) の3分画が存在することが知られている。

CuZn-SODは脳虚血再灌流後の脳梗塞形成に対して保護的に働くことがCuZn-SOD活性が高いトランスジェニックマウスにおいて報

告されているが^{22,23}、その保護機構について詳細な機序は未だ不明な点が多い。またMn-SODやextracellular-SODについては虚血再灌流後の病態における役割は未だ一定した見解がない。

近年マウスにおける遺伝子操作技術によりCuZn-SOD遺伝子 (*Sod1*) またはMn-SOD遺伝子 (*Sod2*) の欠損したマウスがそれぞれ作成された^{24,25}。*Sod1* 遺伝子欠損マウス

(*Sod1* Kn) ではCuZn-SOD活性が正常の野生型マウス (wild-type; WT) に比較してheterozygous (*Sod1* Kn +/-) において約50%、homozygous (*Sod1* Kn -/-) において約100%低下している。*Sod2* 遺伝子欠損マウス (*Sod2* Kn) も同様にheterozygous

(*Sod2* Kn +/-) において約50%、homozygous (*Sod2* Kn -/-) において約100%のMn-SOD活性の低下が認められる。これらの遺伝子欠損マウスを用いることで、様々な病態におけるCuZn-SODおよびMn-

SODについて個々の研究応用が可能となった。

本研究の目的は脳虚血再灌流後の活性酸素
による中枢神経障害におけるMn-SODが、
Cu-Zn-SODの役割について検討することであ
る。各遺伝子欠損マウスの表現型は、*Sod1*
*Ko*では*Sod1*^{-/-}*Ko*、および*Sod1*^{-/-}*Ko*の再
灌流においてWTと差異は認めず、調査のとな
り表現型を月までは正常発育することが確認
されているが²⁴、*Sod1*^{-/-}*Ko*では*Sod1*^{-/-}*Ko*
はWTと差異は認めないものの、*Sod1*^{-/-}*Ko*
では脳脊髄神経系変化と肝臓および骨格筋で
の脂肪の蓄積を示し、生後1月を経て死にす
ることが報告されている²⁵。本研究では、こ
れら遺伝子欠損マウスのうち表現型において
WTと差異を認めない*Sod1*^{-/-}*Ko*、*Sod1*^{-/-}
Ko、および*Sod1*^{-/-}*Ko*に対し、中大脳動
脈閉塞による脳虚血再灌流後の発時的な活性
酸素の産生、脳虚血におけるDNAの損傷化、
および急性期の脳脊髄系と神経学的所見に

(3) 研究目的

本研究の目的は脳虚血再灌流後の活性酸素による中枢神経障害におけるCuZn-SODおよびMn-SODの役割について検討することである。各遺伝子欠損マウスの表現型は、*Sod1* Knでは*Sod1* Kn +/-および*Sod1* Kn -/-の両方においてWTと差異は認めず、現在のところ生後6カ月までは正常発育することが確認されているが²⁵、*Sod2* Knでは*Sod2* Kn +/-はWTと差異は認めないものの、*Sod2* Kn -/-は拡張性心筋症様変化と肝臓および骨格筋での脂肪の蓄積を示し、生後10日程で死亡することが報告されている²⁴。本研究では、これら遺伝子欠損マウスのうち表現型においてWTと差異を認めない*Sod1* Kn +/-、*Sod1* Kn -/-および*Sod2* Kn +/-に対し、中大脳動脈閉塞による局所脳虚血を負荷し、それぞれにおける局所脳虚血再灌流後の経時的な梗塞巣の広がり、梗塞巣におけるDNAの断裂化、および急性期の脳浮腫形成と神経学的所見に

ついてWTとの比較検討を行った。

1.1. 実験動物

Sod1 遺伝子欠損マウス (*Sod1*^{-/-} Ka) およ
び *Sod1* 遺伝子欠損マウス (*Sod1*^{-/-} Ka) はそれ
ぞれ embryonic stem (ES) cell 内で
homologous recombination (相同置換) 法
を用いて作成した (26, 27)。

Sod1^{-/-} Ka において ES cell 内でマウス
CuZn SOD をコードした 5 個の exon を含
む遺伝子領域 (*Sod1*^{-/-} Ka) を neomycin 耐
性遺伝子に置換した。相同置換としては相換
入領域の 3' 末端側に 4.7 kb (*HindIII*-*BacRI*)、
3' 末端側に 3.6 kb (*XbaI*-*BacRV*) を設置し
た。Targeting vector は相同領域付とす。
neomycin 耐性遺伝子を含む 9.3 kb の DNA で
これを ES cell へ microinjection し、
electroporation により相同置換を行った。
置換え ES cell を培養後、genomic DNA を
ApaI および *SspI* にて制限酵素消化し置換えを
確認し、置換えの起こっている細胞株を 20-1

(4) 研究方法

1) 実験動物

Sod1 遺伝子欠損マウス (*Sod1* Kn) および *Sod2* 遺伝子欠損マウス (*Sod2* Kn) はそれぞれ embryonic stem cell (ES cell) 内で homologous recombination (相同組換え) 法を用い作成した^{24, 25}。

Sod1 Kn については ES cell 内でマウス CuZn-SOD をコードした 5 個の exon 全てを含む遺伝子領域 (*EcoRI*-*KpnI*) を neomycin 耐性遺伝子に置換した。相同領域としては組換え領域の 5' 末端側に 4.9 kb (*HindIII*-*EcoRI*)、3' 末端側に 3.6 kb (*KpnI*-*EcoRV*) を設定した。Targeting vector は相同領域および neomycin 耐性遺伝子を含む 9.8 kb の DNA で、これを R1 ES cell へ microinjection し、electroporation により相同組換えを行った。組換え ES cell を培養後、genomic DNA を *ApaI* および *SpeI* にて制限酵素消化し組換えを確認、組換えの起こっている細胞株を CD-1

系統のマウス受精卵にmicroinjectionしキメラマウスを作成した。雄キメラマウスを雌CD-1マウスと交配しheterozygous (*Sod1* Kn +/-) マウスを作成、*Sod1* Kn +/--同士の交配によりhomozygous (*Sod1* Kn -/-) マウスを作成した²⁵。

Sod2 KnについてはES cell内でマウスMn-SODをコードした5個のexonのうちMn-SODの39個のアミノ酸をコードする第3 exonを含む遺伝子領域 (*BalI*-*XbaI*) をneomycin耐性遺伝子に置換した。相同領域としては組換え領域の5'末端側に1.7 kb (*BalI*-*BalI*)、3'末端側に7.3 kb (*XbaI*-*EcoRI*) を設定した。Targeting vectorは相同領域およびneomycin耐性遺伝子を含む16 kbのDNAで、これをCB1-4 ES cellへmicroinjectionし、electroporationにより相同組換えを行った。組換えES cellを培養後、genomic DNAを*EcoRI*にて制限酵素消化し組換えを確認、組換えの起こっている細胞株をCD-1系統のマ

ウス受精卵にmicroinjectionしキメラマウスを作成した。キメラマウスより *Sod1* Knマウスと同様の方法でheterozygous (*Sod2* Kn +/-) およびhomozygous (*Sod2* Kn -/-) マウスを作成した²⁴。

各遺伝子欠損マウスの選定はマウスの尾より抽出したDNAをPCR法により増幅した後、制限酵素消化により組換えES cell選定と同様の方法で行った。各遺伝子欠損マウスの大脳におけるSOD活性を O_2^- 消去能を指標にチトクロームc還元法を用い測定した²⁶。CuZn-SODおよびMn-SOD個々の活性については、KCNによりCuZn-SOD活性を阻害することでMn-SOD活性を単独に測定し、全SOD活性よりMn-SOD活性を減じることでCuZn-SOD活性を算出した。

2) 局所脳虚血再灌流モデル

マウスの局所脳虚血再灌流はYangらのsuture monofilament insersionモデルに準じ

て作成した²³。生後3ヶ月、体重35-40 gの雄マウスを自発呼吸下で30% O₂ / 70% N₂Oにisofluraneを混合した吸入麻酔にて麻酔した後、仰臥位で固定し、頸部に1.5 cmの正中切開をおいた。左側の総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を露出した後、外頸動脈を結紮切離し、その断端より5-0ナイロンのmonofilament sutureを挿入した。Sutureの先端を内頸動脈へ12 mm挿入することで、左中大脳動脈領域に局所脳虚血を負荷した。虚血時間は通常の野生型マウスにおいて梗塞領域が虚血中心部の大脳基底核部から辺縁域の大脳皮質まで進展する1時間とし、その後sutureを抜去することで再灌流を行った。術中はheating padにて直腸温を37±0.5°Cに調節した。虚血中の生理学的パラメーターは虚血後の脳梗塞巣の形成に影響を与えるとの報告²⁷があるため、虚血前後の中大脳動脈領域の脳血流量を経頭蓋的にlaser doppler flowmetryにて、また術中の平均血圧および

術後の血液ガス分析を左大腿動脈のカニュレーションにて測定し、各遺伝子欠損マウスとWTとの間で比較検討を行った。

3) 梗塞体積および虚血半球拡大率の測定

局所脳虚血再灌流後の梗塞体積および虚血半球拡大率を組織学的に測定し、各遺伝子欠損マウスとWTマウスとの間で比較検討を行った。再灌流時間は*Sod1* Knにおいては梗塞巣がプラトーに達する24～48時間とその前後を検討するため8、24、48、96時間を設定したが、*Sod1* Kn $-/-$ では再灌流後4時間以内に全マウスが死亡したため*Sod1* Kn $+/-$ のみで梗塞体積および虚血半球拡大率の検討を行った ($n=4-8$)。 *Sod2* Knにおいてはすでに1時間虚血24時間再灌流においてWTと*Sod2* Kn $+/-$ の間に梗塞体積の差を認めないとの報告²⁸があるため、1、4、8、16時間と短時間の再灌流において梗塞体積および虚血半球拡大率の検討を行った ($n=5$)。

虚血再灌流後にマウスを断頭堵殺し、直ちに脳を摘出、ドライアイスにて凍結、包埋後cryostatにて大脳先端より500 μm 毎に20 μm の冠状断の脳切片を作成し、 -80°C に冷凍保存した。凍結切片をcresyl violetで染色し、染色性の低下した梗塞巣、虚血側大脳半球および対側大脳半球の面積をimage analysis systemで測定した。梗塞巣の染色性の低下は対側大脳半球の当該領域と比較し70%以上の低下を示した部位とした。大脳先端より8 mmまでの領域（計17 slice）で面積を測定し、全sliceの積分値により梗塞巣、虚血側大脳半球および対側大脳半球の体積を算出した。梗塞巣の大きさを% infarction（ $(\text{梗塞体積} / \text{虚血側大脳半球体積}) \times 100\%$ ）、脳浮腫による虚血側大脳半球拡大率を% enlargement（ $[(\text{虚血側大脳半球体積} - \text{対側大脳半球体積}) / \text{対側大脳半球体積}] \times 100\%$ ）として算出した。

4) 梗塞巣におけるDNA断裂化細胞の定量

脳梗塞体積の計測と同様の再灌流時間でDNA断裂化細胞の定量を行い、各遺伝子欠損マウスとWTマウスとの間で比較検討を行った。定量には脳梗塞体積を測定した凍結切片をGabrieliらのTUNEL染色法に準じ染色し²⁰、梗塞巣におけるTUNEL陽性細胞数をカウントすることで行った (n=5-8)。

Bregma直下の凍結切片を4% formaldehydeにて30分固定後、10 μ l/mlの terminal deoxynucleotidyl transferase と10 μ l/mlの biotinylated 16-dUTPを含む溶液で37°C、1時間incubateし、DNAの3'-OH末端をラベルした。SSC溶液 (150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate, pH7.4) で2回洗浄した後、avidin-biotin horseradish peroxidaseにてbiotinをラベルし、horseradish peroxidaseを diaminobenzidineにて発色した。Methyl greenで核染色をした後切片をマウントし、400倍の光学顕微鏡で検鏡、陽性細胞数をカ

ウントした。関心領域として1) 被殻内側の虚血辺縁領域、2) 被殻外側の虚血中心領域、3) 大脳皮質虚血辺縁領域、4) 梨状皮質の4領域を設定し、各々の領域における陽性細胞数を細胞数/cm²で表示した。

5) 脑梗塞巣における Evans blue 血管外漏出の定量

脳虚血再灌流後の脳浮腫は血管原性浮腫と細胞原性浮腫に分類されるが、特に血管原性浮腫は血管内皮細胞障害により生じ、その発生にはO₂⁻が重要な役割を果たしていることが知られている^{1,29}。本研究の組織学的な検討で *Sod1* Kn においてWTと比較し有意な脳浮腫形成傾向を認めたので、虚血再灌流後2、8、24時間の *Sod1* Kn +/- および *Sod1* Kn -/- における Evans blue の血管外漏出を計測し、WTと比較することでCuZn-SOD活性低下による血管内皮細胞の脆弱性の検討を行った (n=4-8)。

脳虚血再灌流負荷を行ったマウスに対し、断頭前1時間に生理食塩水に溶解した0.1 mlの4% Evans blue液を総頸静脈より注入した。*Sod1* Kn +/-では再灌流後2、8、24時間に*Sod1* Kn -/-では再灌流後4時間以内に全マウスが死亡したため再灌流後2時間にマウスを生理食塩水で灌流し、脳を摘出した。摘出脳を50%トリクロル酢酸内で除蛋白した後1000 gで20分間遠心し、上清の吸光度を610 nmの波長にて測定し外部標準にて定量した。

6) 脳虚血再灌流後の運動機能および致死率の評価

虚血再灌流後24時間で組織学的に梗塞巣の拡大を認めた*Sod1* Knにおいて致死率、運動機能の評価を行い、脳梗塞における生命予後、神経学的予後に活性酸素が与える影響についても検討を行った (n=4-21)。

致死率については再灌流後24、48、96時間の時点における(死亡個体数/全個体

数) X100%を致死率として表示した。運動機能については再灌流後24時間の時点で評価を試みたが、*Sod1* Kn -/-では再灌流後4時間以内に全マウスが死亡したため*Sod1* Kn +/-においてYangらの方法に準じて分類評価した²³。スコアリングについては0点；運動機能障害を認めない群、1点；麻痺肢の運動は可能であるが、麻痺側上肢の進展が不可の群、2点；自発歩行は可能であるが、片麻痺による対側への回転運動を示す群、3点；自発性は示しているが、麻痺肢の完全麻痺を示す群、4点；完全片麻痺および意識障害により自発性の認められない群とした。

7) 統計的検討

脳梗塞体積およびDNA断裂化細胞数については*Sod1* Kn +/-および*Sod2* Kn +/-において個々に測定時間毎に平均化し、それぞれの対照群のWTとFisher's protected leased square defference (Fisher's PLSD) を用い

て検定した。Evans blue血管外漏出については *Sod1* Kn +/- および *Sod1* Kn -/- において個々に測定時間毎に平均化し、WTと Fisher's protected leased square defference (Fisher's PLSD) を用いて検定した。虚血再灌流後の運動機能はWTおよび *Sod1* Kn +/- において個々に測定時間毎に平均化し、Mann-Whitney U testを用いて検定した。結果は平均±標準誤差 (S.E.M.) で表示し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

(5) 研究結果

1) 遺伝子欠損マウスにおけるSOD活性

表1に示す如く遺伝子欠損マウスにおけるSOD活性は遺伝子型と一致してWTマウスと比較して*Sod1* KnではCuZn-SOD活性が*Sod1* Kn+/-で $47.6 \pm 4.6\%$ 、*Sod1* Kn -/-で $6.6 \pm 7.6\%$ に低下、*Sod2* KnではMn-SOD活性が*Sod2* Kn+/-で $51.4 \pm 3.8\%$ に低下していた。*Sod1* KnにおけるMn-SOD活性、*Sod2* KnにおけるCuZn-SOD活性はWTマウスと差を認めなかった。

2) 遺伝子欠損マウスにおける脳虚血前後の生理学的パラメーター

表2に示す如く*Sod1* Kn+/-、*Sod1* Kn -/-および*Sod2* Kn+/-マウスにおいて虚血中の平均動脈血圧および虚血後の血液ガス分析でWTマウスと有意な差を認めなかった。虚血領域の残存血流量についても*Sod1* Kn+/-、*Sod1* Kn -/-および*Sod2* Kn+/-マウスとも虚

血前値の 11 ~ 13 % に低下し、WT マウスと差を認めなかった。

3) 脳梗塞体積

Sod1 Kn における虚血側大脳半球に対する梗塞体積の割合は、図 1 A に示す如く再灌流後 8 時間では WT、*Sod1* Kn+/- とともに大脳基底核領域にわずかな梗塞巣を認めたが (WT, $4.2 \pm 0.3\%$; *Sod1* Kn+/-, $7.1 \pm 0.5\%$)、両群間に有意差を認めなかった。しかし 8 時間以降は、24 時間 (WT, $28.4 \pm 3.4\%$; *Sod1* Kn+/-, $53.0 \pm 5.5\%$; $p < 0.01$)、48 時間 (WT, $33.1 \pm 3.3\%$; *Sod1* Kn+/-, $55.0 \pm 6.1\%$; $p < 0.01$)、96 時間 (WT, $32.2 \pm 3.5\%$; *Sod1* Kn+/-, $47.7 \pm 3.3\%$; $p < 0.05$)、と *Sod1* Kn+/- において WT と比較し有意な梗塞体積の増大を認めた。

Sod2 Kn においては図 2 A に示す如く再灌流後 1 時間では WT、*Sod2* Kn+/- とともに梗塞巣の形成はほとんどを認められなかった (WT,

2.3±0.4%; *Sod2* Kn+/-, 4.1±0.7%)。再灌流後4時間ではWTにおいては脑梗塞の形成が認められなかったのに対し、*Sod2* Kn+/-では梗塞巣が辺縁領域まで有意に拡大していた(WT, 3.2±0.4%; *Sod2* Kn+/-, 26.8±5.8%; $p<0.01$)。この傾向は再灌流後8時間まで継続したが(WT, 7.3±2.3%; *Sod2* Kn+/-, 29.4±2.6%; $p<0.01$)、16時間ではWTにおいても梗塞巣の拡大を示し(WT, 28.6±2.5%, *Sod2* Kn+/-, 30.1±1.9%)、両群間に有意差を認めなかった。

4) 虚血半球拡大率

Sod1 Knにおいては、虚血半球拡大率は脑梗塞体積の変化と類似した結果を得た。図1Bに示す如く再灌流後8時間ではWT、*Sod1* Kn+/-ともわずかな虚血半球の拡大を認めたが(WT, 4.4±1.1%; *Sod1* Kn+/-, 6.9±0.9%)、両群間に有意差を認めなかつ

た。虚血半球は*Sod1* Kn+/-において24時間で著明に腫脹し、WTと比較し有意な虚血半球の拡大を認めた (WT, $8.9 \pm 1.6\%$; *Sod1* Kn+/-, $22.7 \pm 4.6\%$; $p < 0.01$)。この虚血半球の拡大は48～96時間で*Sod1* Kn+/-において時間と共に縮小し、48時間 (WT, $10.4 \pm 1.3\%$; *Sod1* Kn+/-, $18.8 \pm 3.0\%$)、96時間 (WT, $11.8 \pm 1.9\%$; *Sod1* Kn+/-, $16.6 \pm 4.3\%$) 共、WTとの間に有意差を認めなかった。

Sod2 Knにおいては図2Bに示す如く再灌流後1時間ではWT、*Sod2* Kn+/-とも虚血半球の拡大を認めなかった (WT, $1.3 \pm 1.2\%$; *Sod2* Kn+/-, $2.8 \pm 1.6\%$)。再灌流後4～8時間では*Sod2* Kn+/-において明らかな梗塞巣の形成を認めるにも関わらず、虚血半球の拡大は4時間 (WT, $2.1 \pm 1.4\%$; *Sod2* Kn+/-, $4.3 \pm 2.2\%$)、8時間 (WT, $7.3 \pm 0.9\%$; *Sod2* Kn+/-, $9.4 \pm 1.9\%$) とWTと比較して有意差を認めなかった。再灌流後16時間で

はWTおよび*Sod2* Kn+/-において虚血半球の拡大を認めたが (WT, $8.5 \pm 1.0\%$; *Sod2* Kn+/-, $10.3 \pm 1.1\%$)、両群間に有意差を認めなかった。

5) 脳梗塞巣におけるDNA断裂化細胞

脳梗塞巣におけるTUNEL染色において障害細胞は虚血中心部と虚血辺縁部で異なった染色性を示した。WTマウスの再灌流後24時間のTUNEL染色および同一領域のヘマトキシリン-エオジン (H & E) 染色の結果を図3に示した。虚血負荷のない対側の正常の脳基底核の神経細胞は本研究で用いた凍結切片においても比較的均一でスムーズな細胞質と核の形態を維持していた (A)。これら正常の神経細胞はTUNEL染色によってラベルされなかった (B)。虚血側の脳基底核の虚血辺縁部においては (C) の如く核クロマチンの濃縮と細胞の萎縮を示す神経細胞が大半を占めていた。これらの所見はapoptotic

な細胞死の過程と一致する。虚血側の脳基底核の虚血中心部においては（E）の如く不正形の核とエオジンの染色性の低下した細胞質を有する膨化した神経細胞が大半を占めていた。これらの所見はnecroticな細胞死の過程と一致する。TUNEL染色により、Apoptoticな細胞は核が濃染され、また核の周囲に同様に濃染される'apoptotic body'と呼ばれる小型の胞体を伴っており（D）、necroticな細胞は核が淡染されるのみで（F）、2種類の細胞死の違いを明確に捕えることが可能であった。遺伝子欠損マウスの虚血再灌流後のDNA断裂化細胞については上記のTUNEL染色により核が濃染され、核の周囲に'apoptotic body'を伴った細胞のみをTUNEL陽性細胞として関心領域内で細胞数をカウントすることで計測した。

Sod1 Knにおいては脳梗塞体積の場合と同様に*Sod1* Kn -/-が全例虚血後数時間で死亡したためWTと*Sod1* Kn+/-の間で比較検討を

行った。図 4 に示す如く再灌流後 8 時間では WT、*Sod1* Kn+/- とも TUNEL 陽性細胞の出現をほとんど認めなかった。TUNEL 陽性細胞は 24 ~ 48 時間で再灌流時間と共に増加し、全関心領域において *Sod1* Kn+/- で WT と比較し有意な TUNEL 陽性細胞の出現を認めた ($p < 0.01-0.05$)。再灌流後 96 時間では piriform cortex では少数の TUNEL 陽性細胞を認めたが (D)、その他 3 領域では TUNEL 陽性細胞はほぼ消失しており (A, B, C)、全領域とも *Sod1* Kn+/- と WT との間に有意な差を認めなかった。

Sod2 Kn においては図 5 に示す如く再灌流後 1 ~ 8 時間まで WT、*Sod2* Kn+/- とも TUNEL 陽性細胞の出現をほとんど認めなかった。特に *Sod2* Kn+/- においては明らかな梗塞巣の形成を認めるにも関わらず、梗塞巣内の障害細胞は TUNEL 染色により核が淡染される necrotic な細胞死を示す細胞が主体を占めていた。再灌流後 16 時間では WT、

Sod2 Kn+/-ともTUNEL陽性細胞の出現を認めたが、両群間に有意差を認めなかった。

6) 梗塞巣におけるEvans blue血管外漏出

虚血再灌流後2時間で図6Aに示す如くWTでは肉眼的なEvans blueの血管外漏出を認めないのに対し、*Sod1* Kn+/-では虚血中心部に、*Sod1* Kn-/-では虚血部全域に肉眼的なEvans blueの血管外漏出を認めた。

Evans blueの定量は虚血側大脳半球内のEvans blueを再灌流後経時的に計測、コントロールは非虚血側大脳半球内のEvans blue量とした。*Sod1* Kn-/-が全例虚血後数時間で死亡したため再灌流後2時間ではWT、*Sod1* Kn+/-、*Sod1* Kn-/-の3群で検討したが、8、24時間ではWTと*Sod1* Kn+/-の間で比較検討を行った。図6Bに示す如く非虚血側大脳半球内のEvans blue量 (Ctrl.) は3群間で有意な差を認めなかった (WT, 0.23 ± 0.02 ; *Sod1* Kn+/-, 0.22 ± 0.01 ; *Sod1* Kn-/-,

0.24±0.05 μg / hemisphere) 。再灌流後 2 時間では WT で虚血側大脳半球内の Evans blue 量の増加を認めないのに対し、*Sod1* *Kn*+/-、*Sod1* *Kn* -/- においては CuZn-SOD 活性の低下に依存性に Evans blue の血管外漏出量の増加を認めた (WT, 0.26±0.02; *Sod1* *Kn*+/-, 0.81±0.15; *Sod1* *Kn* -/-, 2.21±0.49 μg / hemisphere; $p<0.01$) 。再灌流後 8 ないし 24 時間では WT においても Evans blue の血管外漏出量の増加を認め、8 時間 (WT, 0.63±0.11; *Sod1* *Kn*+/-, 1.06±0.18 μg / hemisphere) 、および 24 時間 (WT, 1.01±0.21; *Sod1* *Kn*+/-, 1.32±0.14 μg / hemisphere) と、WT と *Sod1* *Kn*+/- との間に有意差を認めなかった。

7) 脳虚血再灌流後の致死率と運動機能

虚血再灌流後 24、48、96 時間の時点における WT、*Sod1* *Kn*+/-、*Sod1* *Kn* -/- の致死率を表 3 に示した。24 時間の時点では

WTの致死率は11.1%であるのに対し、*Sod1* *Kn+/-*では23.8%と高率であった。*Sod1* *Kn-/-*においては致死率の検討を行った8匹全てが虚血再灌流後数時間で死亡したため24時間の時点での致死率は100%となり、以後の検討は行わなかった。*Sod1* *Kn+/-*における高率な致死率は虚血再灌流後48～96時間まで継続して認められた。

虚血再灌流後24時間の時点での生存マウスの運動機能スコアリングを表4に示した。WTでは 1.31 ± 0.25 点、*Sod1* *Kn+/-*では 2.00 ± 0.20 点と*Sod1* *Kn+/-*において運動機能が有意に悪化していた ($p < 0.05$)。

(6) 考察

CuZn-SODおよびMn-SODの正常状態下および病態下における生物学的役割はいまだ不明の点が多い。本研究に用いた遺伝子欠損マウスの正常状態下の検討より*Sod1* KnではCuZn-SOD活性がほぼ完全に消失している*Sod1* Kn-/-においても表現型にWTと差がなく正常発育を示す²⁵ことから、正常状態下の細胞質内での O_2^- の発生量は生体において深刻な影響を及ぼすほどではないことが推察される。しかしながら*Sod1* KnにおいてはCuZn-SODの低下に伴い、顔面神経のaxotomy後の上位性運動神経細胞の変成が強く認められ、損傷からの回復過程においてCuZn-SODが重要な働きをしていることが報告されている²⁵。これに対し*Sod2* KnにおいてはMn-SOD活性がほぼ完全に消失している*Sod2* Kn-/-は拡張性心筋症様変化と肝臓および骨格筋での脂肪の蓄積を示し、生後10日程で死亡にいたる²⁴。この*Sod2* Kn-/-ではミ

トコンドリアの電子伝達系酵素複合体IIの succinate dehydrogenase およびTCA回路の構成酵素であるaconitaseの活性が低下しており²⁴、Mn-SODは正常状態下において電子伝達系および酸化リン酸化の過程での副産物である O_2^- を消去することでミトコンドリアにおける酵素複合体を維持し、生体のエネルギー代謝に重要な働きをしていることが明らかになった。虚血再灌流では虚血によって起こる酸素供給の停止により、エネルギー代謝を含む細胞内代謝が変化し、その後の再灌流によって酸素が再供給されると、 O_2^- をはじめとする活性酸素種が過剰に発生し、過酸化障害が修飾されることが報告されている^{1,3,4,5}。 O_2^- の産生源としては細胞質内における xanthine oxidase 系やアラキドン酸カスケードの虚血後の活性化による産生、ミトコンドリアにおける再灌流後の電子伝達系の活性化による複合体IおよびIIIからの産生が挙げられるが、それぞれの部位より過剰産生される

O_2^- が虚血再灌流後の中枢神経細胞障害をどのような機構で修飾するかはいまだ不明である。

本研究では*Sod1* Knにおいて再灌流後24時間以降でWTと比較して最終的な梗塞体積の有意な増大が認められた。これは再灌流後の脳梗塞巣が広範囲に虚血辺縁領域まで進展するためであり、細胞質内で発生する O_2^- が虚血辺縁領域の細胞障害の重要な要素であることが示唆された。この結果はCuZn-SODの活性がWTと比較して上昇しているトランスジェニックマウスにおいてCuZn-SODが虚血再灌流後の虚血辺縁領域での脳梗塞形成に保護的に働いているとの報告^{22,23}と一致している。

これに対し*Sod2* Knにおいては最終的な梗塞体積はWTと同様であるが、WTと比較して再灌流後、より早期からの梗塞巣形成を認め、ミトコンドリアで発生する O_2^- は再灌流後ごく早期の細胞障害、もしくは虚血自体に対す

る細胞の脆弱性における重要な要素であることが示唆された。*Sod2* KnではWTにおいて梗塞巣の形成をほぼ認めない30分虚血24時間再灌流においても有意に梗塞巣の形成を認めるとの報告があり²⁸、ミトコンドリアで発生する O_2^- が細胞の虚血に対する脆弱性に関与していることを裏付けている。

CuZn-SODについては外因性の投与により脳虚血部位の残存血流量を増加させることで虚血再灌流後の脳梗塞形成に保護的に働くとの報告がある³⁰。しかし本研究においては虚血部位の残存血流量を含めた生理学的パラメーターにおいてWTマウスと有意な差を認めなかった。この結果は内因性のCuZn-SOD活性の変化は虚血部位の残存血流量に変化を与えないとの過去の報告^{23,31,32}と一致する。また*Sod2* Knにおいても虚血部位の残存血流量を含めた生理学的パラメーターにおいてWTマウスと有意な差を認めなかったことから、本研究における*Sod1* Knおよび*Sod2* Kn

における上記のような虚血再灌流後の脳梗塞形成の増悪はSOD活性の低下による細胞内の生物化学的反応の違いによるものと考えられる。

現在まで脳梗塞におけるapoptosisの関与については多くの報告がなされている^{12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19}。本研究の脳梗塞巣におけるapoptosisの検討ではTUNEL染色において異なった染色性を示す2種類の細胞群が認められた。TUNEL染色によるapoptosisの検討についてはnick endolabeling法はnecrosisにおけるrandom cleavageを示すDNA末端も認識するため、慎重な検討が必要であるとされている。脳梗塞巣においてもnecrosisを起こしている細胞はapoptosisを起こしている細胞と共にTUNEL染色によりラベルされるが、染色の度合、および細胞形態の違いからapoptosis細胞とnecrosis細胞とを区別することが可能であると報告されている¹⁵。本研究においては2種類の染色性を示す細胞群の

一方をTUNEL陽性細胞として検討を行ったが、この細胞群は1) 染色性において核が濃染され、核の周囲に'apoptotic body'を伴っていること、2) WTマウスにおいて虚血再灌流後24～48時間で虚血辺縁領域を中心に出現することなど、従来報告されている脳虚血後のapoptosis細胞の特徴と一致している。また本研究では検討を行わなかったが、脳虚血後に中枢神経系でapoptosisを起こすのは神経細胞に特異的であることが免疫染色等を用いた検討で明らかになっており¹⁶、これらの報告から本研究で検討したTUNEL陽性細胞はapoptosisを起こしている神経細胞と考えられる。

Apoptosisは局所脳虚血においては虚血辺縁領域に多く認められること^{16,17}、また短時間の局所脳虚血後に数週間の長期再灌流で形成される梗塞巣に認められること¹⁹が報告されている。また全脳虚血後の海馬CA1における遅発性神経細胞死もapoptosisによるとの

報告もあり、これらの報告より脳虚血後の apoptosis は遅発性の神経細胞死を介して脳梗塞巣形成に関与していると考えられる。*Sod1* *Kn* では虚血再灌流後の脳梗塞巣全域において有意な TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。培養神経細胞を用いた *in vitro* の検討においては CuZn-SOD は血清由来の栄養因子の欠落による神経細胞の apoptosis を遅らせるとの報告²¹ からも細胞質内で発生する O_2^- は神経細胞の apoptosis の増悪因子と考えられる。*Sod1* *Kn* における TUNEL 陽性細胞の増加は虚血再灌流後の梗塞巣形成と時間経過が一致しており、脳虚血再灌流後細胞質内で発生する O_2^- は神経細胞の apoptosis を介して脳梗塞巣の増大をもたらす一因子であると考えられる。

これに対し *Sod2* *Kn* では虚血再灌流後の早期に形成される脳梗塞巣において TUNEL 陽性細胞の出現を認めなかった。この結果は *Sod2* *Kn* における再灌流後早期の梗塞性変化は、apoptosis による細胞死の過程を経ないもので

あることを示唆している。Apoptosisは細胞死の過程で蛋白合成を必須とするため、高度のミトコンドリア障害によりエネルギー産生の低下した細胞においてはapoptosisは起こり難いものと考えられる。グルタミン酸投与による培養神経細胞の障害においてはミトコンドリアの障害の程度が高度であると、細胞死の形態がapoptosisからnecrosisに傾くと報告されている³³。しかしながら*Sod2* Knでは虚血再灌流8時間以降のTUNEL陽性細胞についてはWTと差を認めず、Mn-SOD活性の低下はapoptosisによる細胞死の過程に影響を与えていないものと考えられる。このため、*Sod2* Knの脳梗塞の形成過程においては細胞死の形態がapoptosisからnecrosisに傾いたとは考え難く、Mn-SOD活性の低下によるミトコンドリアでの多量の O_2^- により本来necrosisを起こす細胞において虚血後早期にミトコンドリア障害が起こりnecrosisのみ速まった可能性が考えられる。

Sod1 Knでは虚血再灌流後の脳梗塞の形成に伴い虚血半球拡大率の有意な増大を認めた。この結果は*Sod1* Knにおける脳梗塞の増悪に脳浮腫形成が関与していることを示唆している。脳虚血再灌流後の脳浮腫は血管原性浮腫と細胞原性浮腫に分類されるが、血管原性浮腫は血管内皮細胞障害により生じ、細胞原性浮腫は主に神経膠細胞特に星状膠細胞の障害により生ずるとされている¹。*Sod1* KnにおけるEvans blue血管外漏出の検討においてCuZn-SOD活性の低下により虚血再灌流後早期から高度の血液脳関門の破綻が認められた。血液脳関門を構成する血管内皮細胞は活性酸素による修飾を受けやすく^{34,35}、特に細胞質に多量のxanthine oxidaseを含有しており、低酸素再酸素化後にATPが分解されて生じたhypoxanthineを基質として大量の O_2^- が発生することが知られており^{36,37}、同様の現象が虚血再灌流後にも起こると推測される。*Sod1* Knではこの細胞質内で発生する O_2^- が血管内

皮細胞障害を介して虚血再灌流障害を修飾している可能性が示唆された。これに対し*Sod2* Knにおける再灌流後早期の脳梗塞においては虚血半球の拡大を伴っておらず、この梗塞性変化は脳浮腫の関与しないものであり血管内皮細胞障害や神経膠細胞障害の関与は否定的である。即ち虚血再灌流後にミトコンドリアで発生する O_2^- は比較的選択的に神経細胞障害を起こす可能性が示唆された。

Sod1 Knにおいては以上の組織学および生化学的な脳梗塞の悪化のみならず、神経学的予後および致死率についても悪化が確認された。神経学的予後についてはこれまでCuZn-SOD活性の上昇しているトランスジェニックマウスにおいて梗塞巣の縮小と共に神経学的予後の改善が認められるとの報告²³と一致した結果であった。虚血再灌流後急性期の致死率についてはマウスにおいてはこれまで報告されていないが、脳腫脹による脳ヘルニアなど脳浮腫による死亡が致死率を左右す

る重要な因子と考えられる。急性期の致死率が100%であった*Sod1* *Kn -/-*において、再灌流後早期の血液脳関門破綻が認められたことはこれを裏付けるものである。これらの結果は脳虚血再灌流後に細胞質内で発生する O_2^- は脳梗塞と脳浮腫形成を増強することで神経学的予後と致死率を悪化させることが明らかになり、今後の脳梗塞治療におけるCuZn-SODの臨床応用の可能性が示唆された。*Sod2* *Kn*においては今回の研究においては最終的な梗塞巣の拡大においてWTと差を認めなかったが、その形成過程において神経細胞の虚血自体に対する脆弱性が示唆され、今後の検討を要するものと思われる。

(7) 結論

1. CuZn-SODもしくはMn-SOD活性の低下した遺伝子欠損マウスを用いて局所脳虚血再灌流後の中枢神経系障害におけるCuZn-SODおよびMn-SODの役割について検討を行った。
2. CuZn-SODの活性低下により虚血再灌流後の梗塞巣の拡大を、Mn-SODの活性低下により梗塞巣形成の早期化を認めた。
3. CuZn-SODの活性低下による梗塞巣の拡大は神経細胞のapoptosisの増加と血管内皮細胞の障害による脳浮腫形成の悪化を伴っていた。
4. Mn-SODの活性低下による梗塞巣形成の早期化は神経細胞のapoptosisと脳浮腫形成を伴っておらず、神経細胞のnecrosisの早期化によるものであることが示唆された。
5. CuZn-SODの活性低下により虚血再灌流後の神経学的予後および致死率の悪化が認められた。

6. CuZn-SODおよびMn-SODは虚血性神経細胞

障害の進展に重要な保護効果をはたして

いることが示唆された。

57. 508-510.

2. Oliva D. W. (1988) Glutamate excitotoxicity and distress of the nervous system. *Neuron*, 1, 633-634.

3. McCord J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in peroxylase injury. *N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163.

4. Siesjo B. K., Agardh C. D. and Bengtsson E. (1989) Free radicals and brain damage. *Cereb. Brain Metab. Rev.*, 1, 165-211.

5. Chen P. H. (1994) Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.*, 4, 59-65.

6. Patel M., Day B. J., Crapo J. D. et al. (1995) Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*, 16, 333-351.

(8) 文 献

1. Kontos H.A. (1985) Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ. Res.*, 57, 508-516.
2. Choi D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-634.
3. McCord J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163.
4. Siesjö B.K., Agardh C.D. and Bengtsson F. (1989) Free radicals and brain damage. *Cereb. Brain Metab. Rev.*, 1, 165-211.
5. Chan P.H. (1994) Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.*, 4, 59-65.
6. Patel M., Day B.J., Crapo J.D. et al. (1996) Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*, 16, 345-355.

7. Turrens J.F. and Boveris A. (1980)
Generation of superoxide anion by the
NADH dehydrogenase of bovine heart
mitochondria. *Biochem. J.*, 191, 421-427.
8. Bindokas V.P., Jordán J., Lee C.C. et
al. (1996) Superoxide production in rat
hippocampal neurons: selective imaging
with hydroethidine. *J. Neurosci.*, 16,
1324-1336.
9. Gaudet R.J. and Levine L. (1979)
Transient cerebral ischemia and brain
prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res.
Commun.*, 86, 893-901.
10. Chan P.H., Fishman R.A., Schmidley
J.W. et al. (1984) Release of
polyunsaturated fatty acids from
phospholipids and alteration of brain
membrane integrity by oxygen-derived free
radicals. *J. Neurosci. Res.*, 12, 595-605.
11. Siesjö B.K. (1984) Cerebral
circulation and metabolism. *J.
Neurosurg.*, 60, 883-908.

12. Linnik M.D., Zobrist R.H. and Hatfield M.D. (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 24, 2002-2009.
13. Tominaga T., Kure S., Narisawa K. et al. (1993) Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain Res.*, 608, 21-26.
14. MacManus J.P., Hill I.E., Huang Z.G. et al. (1994) DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischaemic neocortex. *NeuroReport*, 5, 493-496.
15. Charriaut-Marlangue C. and Ben-Ari Y. (1995) A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *NeuroReport*, 7, 61-64.
16. Li Y., Chopp M., Jiang N., et al. (1995) Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 389-397.

17. Li Y., Chopp M., Jiang N. et al.
(1995) In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 28, 164-168.
18. Charriaut-Marlangue C., Margail I., Represa A. et al. (1996) Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: An in situ DNA fragmentation analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, 186-194.
19. Du C., Hu R., Csernansky C.A. et al. (1996) Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: A role for apoptosis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, 195-201.
20. Gavrieli Y., Sherman Y. and Ben-Sasson S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
21. Greenlund L.J.S., Deckwerth T.L. and Johnson E.M. Jr. (1995) Superoxide

dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*, 14, 303-315.

22. Kinouchi H., Epstein C.J., Mizui T. et al. (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11158-11162.

23. Yang G., Chan P.H., Chen J. et al. (1994) Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 25, 165-170.

24. Li Y., Huang T.-T., Carlson E.J. et al. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.*, 11, 376-381.

25. Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K. et al. (1996) Motor neurons in Cu/Zn

superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet.*, 13, 43-47.

26. McCord J.M. and Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.

27. Barone F.C., Knudsen D.J., Nelson A.H. et al. (1993) Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, 683-692.

28. Mikawa S., Li Y., Huang T.-T. et al. (1995) Cerebral infarction is exacerbated in mitochondrial manganese superoxide dismutase (*sod-2*) knockout mutant mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Society for Neuroscience Abstract*, 21, 1268.

29. Flamm E.S., Demopoulos H.B., Seligman M.L. et al. (1978) Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 9, 445-447.
30. Cerchiari E.L., Hoel T.M., Safar P. et al. (1987) Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs. *Stroke*, 18, 869-878.
31. Chan P.H., Kamii H., Yang G. et al. (1993) Brain infarction is not reduced in SOD-1 transgenic mice after a permanent focal cerebral ischemia. *Neuroreport*, 5, 293-296.
32. Kondo T., Murakami K., Honkaniemi J. et al. (1996) Expression of hsp70 mRNA is induced in the brain of transgenic mice overexpressing human CuZn-superoxide dismutase following transient global cerebral ischemia. *Brain Res.*, 737, 321-326.
33. Ankarcrona M., Dypbukt J.M.,

Bonfoco E. et al. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15, 961-973.

34. Kondo T., Kinouchi H., Kawase M. et al. (1996) Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia / reoxygenation. *Neurosci. Lett.*, 208, 101-104.

35. Kondo T., Kinouchi H., Kawase M. et al. (1996) Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia / reoxygenation. *Neurosci. Lett.*, 215, 103-106.

36. Betz A.L. (1985) Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J. Neurochem.*, 44, 574-579.

37. Terada L.S., Willingham I.R.,
Rosandich M.E. et al. (1991) Generation
of superoxide anion by brain endothelial
cell xanthine oxidase. *J. Cell Physiol.*,
148, 191-196.

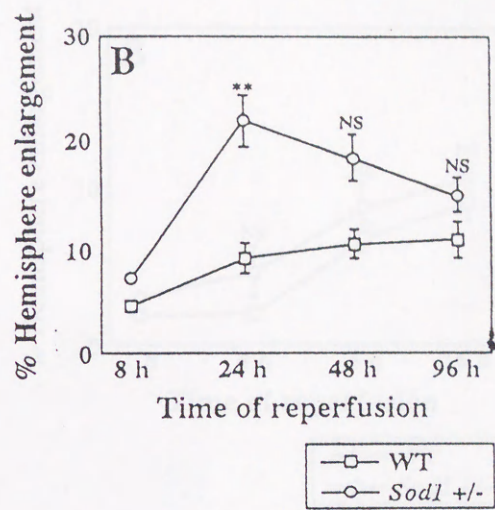
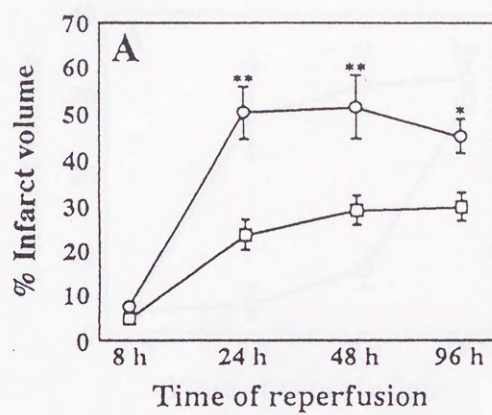


图 1

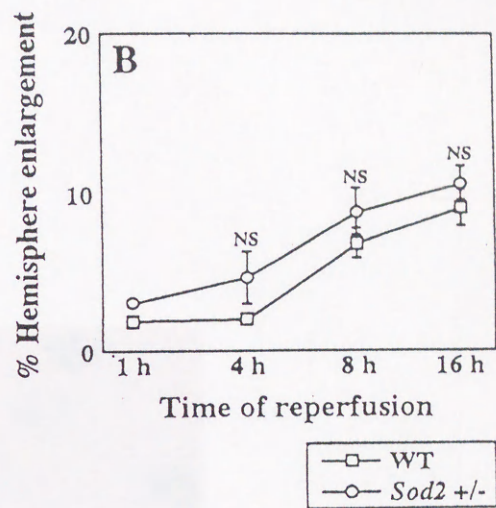
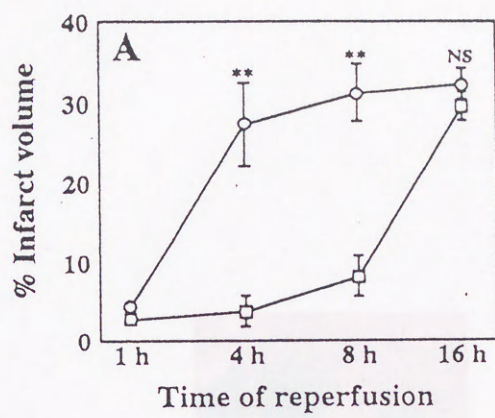


图 2

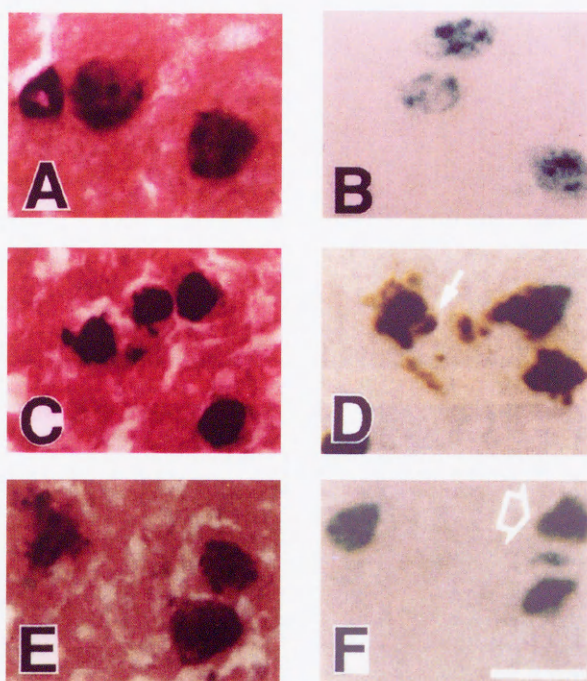
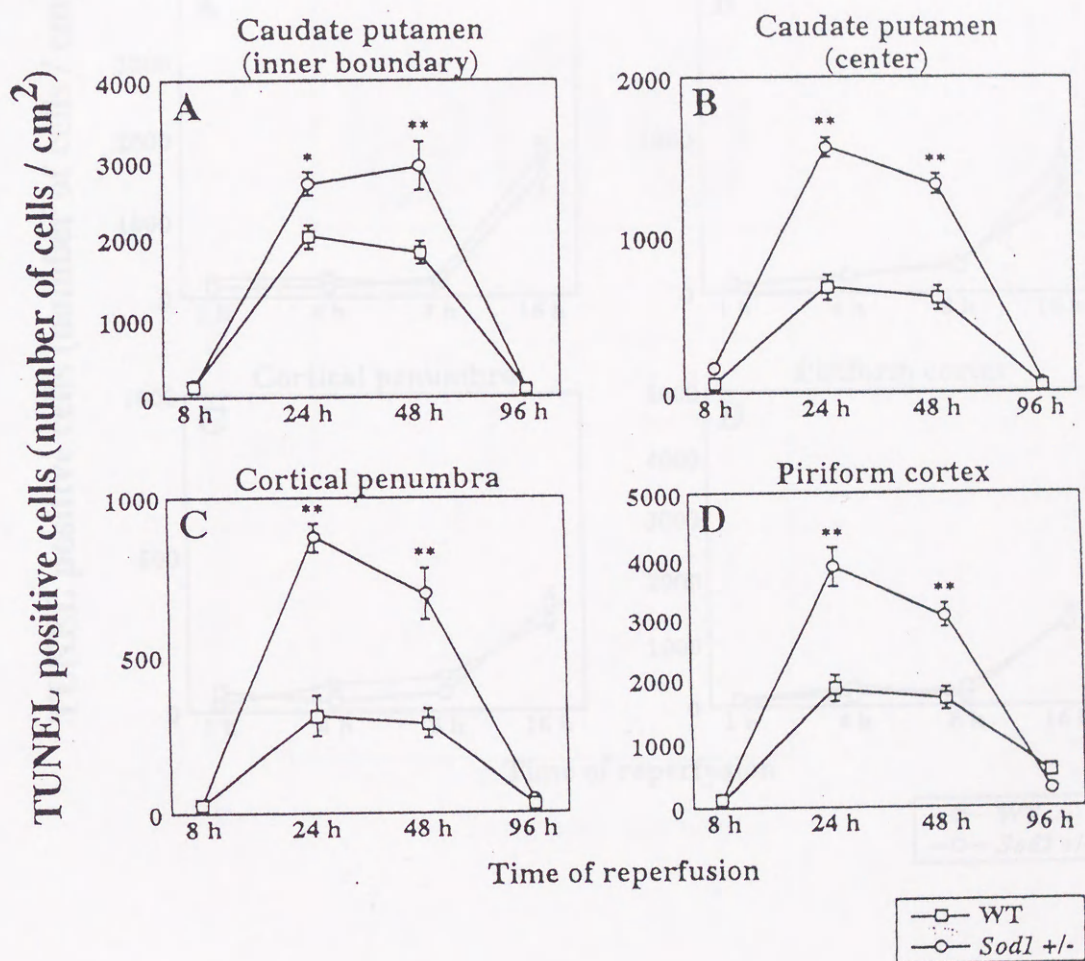


図 3



☒ 4

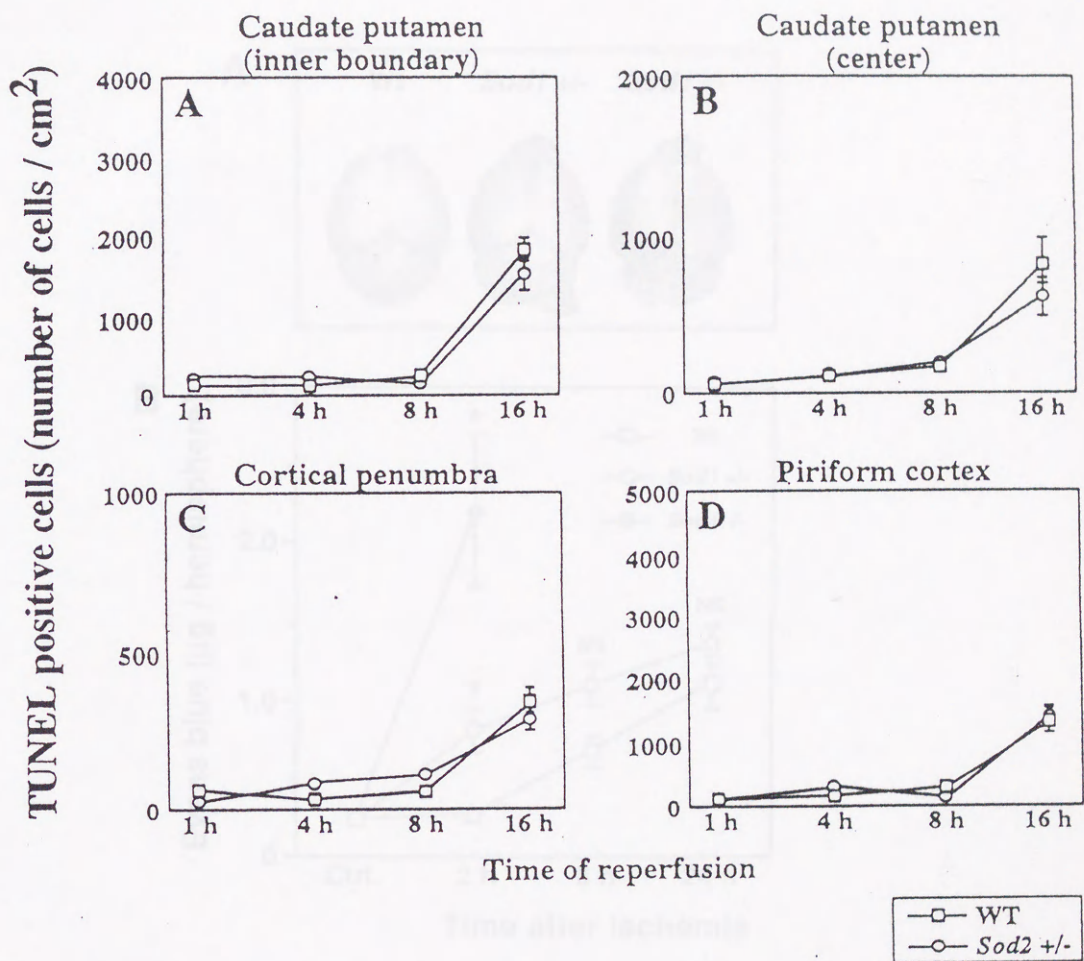


図 5

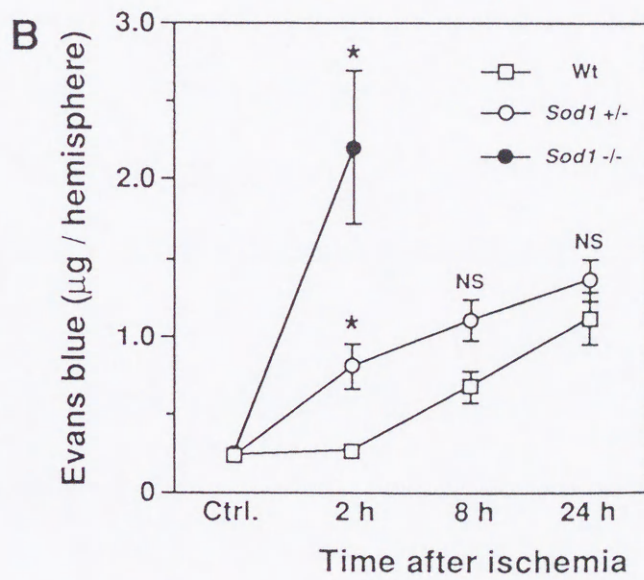
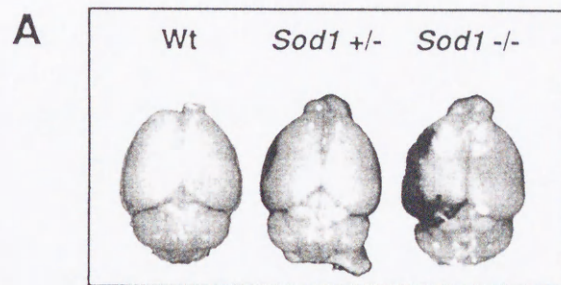


图 6

図説明文

図 1. 虚血再灌流後のWTと *Sod1* Kn +/- (*Sod1* +/-) における虚血半球に対する梗塞巣の割合(A)と虚血半球の対側半球に対する拡大率(B)の経時的変化。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Fisher's PLSD test)。

図 2. 虚血再灌流後のWTと *Sod2* Kn +/- (*Sod2* +/-) における虚血半球に対する梗塞巣の割合(A)と虚血半球の対側半球に対する拡大率(B)の経時的変化。

** : $p < 0.01$, NS : 有意差なし (Fisher's PLSD test)。

図 3. 虚血再灌流 24 時間後のWTマウスにおけるH&E染色(A, C, E)およびTUNEL染色(B, D, F)。(A, B) 対側大脳基底核領域の健常な神経細胞(C, D) 虚血側大脳基底核領域の虚血辺縁部の神経細胞
H&E染色において細胞の萎縮と核クロマチンの濃縮を認める(C)。

TUNEL染色において核の濃染と核周囲

に'apoptotic body'を認める(D, 矢印)。

(E, F) 虚血側大脳基底核領域の虚血中心部の神

経細胞

H&E染色において細胞と核の融解を認

める(E)。

TUNEL染色においては核の淡染像を認

める(F, 空矢印)。

Scale bar, 20 μ m

図4. 虚血再灌流後のWTと *Sod1* Kn +/- (*Sod1* +/-)の梗

塞巣におけるのTUNEL染色陽性細胞数の経時的変化。

(A) 虚血側大脳基底核領域の虚血辺縁部。

(B) 虚血側大脳基底核領域の虚血中心部。

(C) 虚血側大脳皮質の虚血辺縁部。

(D) 虚血側大脳梨状皮質。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Fisher's PLSD test)。

図5. 虚血再灌流後のWTと *Sod2* Kn +/- (*Sod2* +/-)の梗

塞巣におけるのTUNEL染色陽性細胞数の経時

的变化。

(A) 虚血側大脳基底核領域の虚血辺縁部。

(B) 虚血側大脳基底核領域の虚血中心部。

(C) 虚血側大脳皮質の虚血辺縁部。

(D) 虚血側大脳梨状皮質。

全経過においてWTと*Sod2* Kn +/-の間に有意差を認めない。

図6. 虚血再灌流後のWTと*Sod1* Kn +/- (*Sod1* +/-)および*Sod1* Kn -/- (*Sod1* -/-)におけるEvans blue血管外漏出。

(A) 虚血再灌流2時間後の脳の外観。

Sod1 Kn +/-および*Sod1* Kn -/-の左側大脳半球にEvans blue血管外漏出を認める。

(B) Evans blue血管外漏出の経時的变化。

Ctrl: コントロール (対側大脳半球におけるEvans blue量)

** : $p < 0.01$, NS : 有意差なし (Fisher's PLSD test)。

表 1. WT、*Sod1* Kn および *Sod2* Kn の大脳
 実質における CuZn-SOD および Mn-
 SOD 活性。

Genotype	CuZn-SOD	Mn-SOD
WT (n=8)	100	100
<i>Sod1</i> Kn +/- (n=3)	47.7±4.6	102.5±3.5
<i>Sod1</i> Kn -/- (n=3)	6.6±7.6	104.3±2.2
<i>Sod2</i> Kn +/- (n=5)	101.2±1.6	51.4±3.8

SOD 活性は WT における平均値を 100 % と
 し、それに対する割合を平均値±標準誤差
 (mean±SEM) で表示した。

表 2. WT、*Sod1* Kn および *Sod2* Kn における
虚血中の血液ガス分析、平均血圧お
よび虚血域の残存脳血流量。

Genotype	Arterial blood gas analysis			MABP (mm Hg)	Residual CBF (%)
	pH	pCO ₂ (torr)	PO ₂ (torr)		
WT (n=8)	7.30±0.02	42.7±1.2	151.9±13.8	83.0±4.7	12.4±2.7
<i>Sod1</i> Kn +/- (n=4)	7.30±0.02	41.6±2.4	138.5±4.8	90.0±2.1	11.4±4.6
<i>Sod1</i> Kn -/- (n=4)	7.32±0.03	35.2±3.0	165.4±6.9	89.0±6.0	13.3±1.1
<i>Sod2</i> Kn +/- (n=4)	7.29±0.05	38.6±3.5	143.5±10.2	86.2±5.5	13.6±3.7

MABP : mean arterial blood pressure (平均血圧)

Residual CBF : 残存脳血流量 (虚血中の
脳血流量/虚血前の脳血流量) X 100 %

表 3. WTおよび*Sod1* Knにおける虚血再灌
流後の致死率。

Genotype	Number of dead / total animals (% mortality)		
	24 hr	48 hr	96 hr
WT	2/18 (11.1)	2/7 (28.6)	5/9 (55.6)
<i>Sod1</i> Kn +/-	5/21 (23.8)	4/8 (50.0)	7/11 (63.6)
<i>Sod1</i> Kn -/-	8/8 (100)	N/D	N/D

各値は死亡マウス数/全マウス数（致死率％）
で表示した。

N/D：検定不可能。

表 4. WTおよび*Sod1* Knにおける虚血再灌
流 2 4 時間後の運動機能スコアリング。

Genotype	Neurological deficit scores ^a					Mean ± SEM
	0	1	2	3	4	
WT	3	7	5	0	1	1.31±0.25
<i>Sod1</i> Kn +/-	0	4	9	2	1	2.00±0.20*

^a Neurological deficit scores : 運動機能スコアリング。

0 : 運動機能障害を認めない群。

1 : 麻痺肢の運動は可能であるが、麻痺側
上肢の進展が不可の群。

2 : 自発歩行は可能であるが、片麻痺によ
る対側への回転運動を示す群。

3 : 自発性は示しているが、麻痺肢の完全
麻痺を示す群。

4 : 完全片麻痺および意識障害により自発
性の認められない群。

* : $p < 0.05$ (Mann Whitney *U* test)。

WTは17.244 KHzにおける振幅が

2.74 ± 0.25 KHzの振幅を示す。

Genotype	Neurological deficit scores				
	0	1	2	3	4
WT	3	7	2	0	1
2x51 KHz	0	4	9	3	1

Mean ± SEM

23.0 ± 0.22

23.0 ± 0.22

Neurological deficit scores: 運動障害

0-4

0: 運動障害を示すものなし

1: 運動障害の運動は可能であるが、運動障害

1: 運動障害を示すものなし

2: 運動障害は可能であるが、運動障害に

る程度は運動障害を示す。

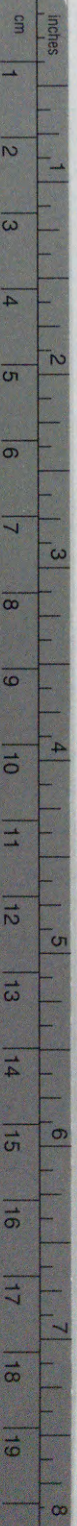
3: 運動障害は示すものなし、運動障害の完全

運動を示す。

4: 完全な運動は1つ運動障害に1つ運動

障害を示すものなし。

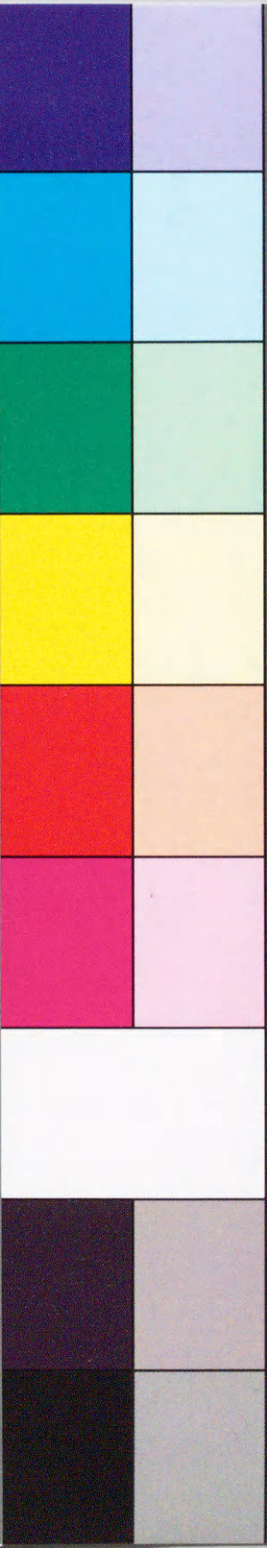
* p < 0.02 (Mann-Whitney U test)



Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

